

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-144148

(43)Date of publication of application : 20.05.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/02  
C07K 16/18  
C12N 5/10  
C12P 21/08  
G01N 30/88  
G01N 33/53

(21)Application number : 2001-352119

(71)Applicant : NIPPON SEKIJIYUUJISHIYA  
ONODERA SETSU

(22)Date of filing : 16.11.2001

(72)Inventor : TSUKUI KAZUO

## (54) MONOCLONAL ANTIBODY TO PRION PROTEIN

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a monoclonal antibody reactive to either of normal prion and abnormal prion derived from different animal species.

SOLUTION: This monoclonal antibody is obtained by the following process: for example, prion protein knockout mouse (PrP0/0) is immunized with prion protein, the splenocyte from the thus immunized animal is hybridized with e.g. lymphoblast, and hybridoma cells which acquired HAT resistance in a HAT selective medium are obtained, and from the resulting cell group, the clone in production of the objective antibody meeting the above-mentioned reactivity. For the analysis of the antibody's characteristics, its recognition reactivity to recombinant prion protein and natural prion protein derived from a plurality of animal species is assessed by the use of a combination of immunoprecipitation method with Western blotting method.

Fig. 1

Fig. 1 shows the results of Western blotting analysis of the monoclonal antibody (1A1) against recombinant prion protein (rPrP) and natural prion protein (nPrP) derived from various animal species. The lanes are labeled as follows: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

25.03.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

09.05.2006

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-144148

(P2003-144148A)

(43) 公開日 平成15年5月20日 (2003.5.20)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-リ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/02		C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 30/88	E 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		33/53	S 4 H 0 4 5
G 0 1 N 30/88		C 1 2 N 15/00	C
審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-352119(P2001-352119)

(22) 出願日 平成13年11月16日 (2001.11.16)

(71) 出願人 000231729

日本赤十字社

東京都港区芝大門1丁目1番3号

(71) 出願人 501445760

小野寺 節

東京都文京区弥生1丁目1番1号 東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻応用免疫学教室内

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオンタンパク質に対するモノクローナル抗体

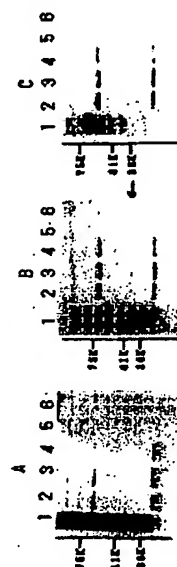
(57) 【要約】

【課題】 異なる動物種からの正常プリオン及び異常プリオンの何れとも反応するモノクローナル抗体の提供。

【解決手段】 例えば、プリオンタンパク質ノックアウトマウス (PrP<sup>0/0</sup>) をプリオンタンパク質により免疫し、免疫された動物からの脾細胞を例えばリンパ芽球と融合させ、HAT選択培地でHAT抵抗性を獲得したハイブリドーマ細胞を得、その細胞群から上記課題を満足する抗体を産生しているクローンを選別する。抗体の特性解析は、複数の動物種に由来するリコンビナントプリオンタンパク質及び天然プリオンタンパク質に対する認識反応性を免疫沈降法およびウエスタンブロット法の組み合わせによって行う。

図5

5 C 8 -105, 5 C 8 -103, 5 C 8 -113aAbのHaPrP、MoPrP、HuPrPに対する結合性、免疫沈降法による検出



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数の動物種に由来する正常プリオン蛋白(PrP<sup>c</sup>)及び異常プリオン蛋白(PrP<sup>sc</sup>)に共通の高次構造を認識する、プリオン蛋白(PrP)に対するモノクローナル抗体(mAb)。

【請求項2】 リコンビナントウシPrP(r BoPrP)に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項3】 リコンビナントハムスターPrP(r HaPrP)に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項4】 リコンビナントマウスPrP(r MoPrP)に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項5】 リコンビナントヒトPrP(r HuPrP)に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項6】 ウシPrP(BoPrP)に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項7】 ハムスターPrP(HaPrP)に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項8】 マウスPrP(MoPrP)に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項9】 ヒトPrP(HuPrP)に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項10】 r BoPrP、r HaPrP、r MoPrPおよびr HuPrPの2以上に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項11】 r BoPrP、r HaPrP、r MoPrPおよびr HuPrPに共通に結合する、請求項10に記載のmAb。

【請求項12】 BoPrP、HaPrP、MoPrPおよびHuPrPの2以上に結合する、請求項1に記載のmAb。

【請求項13】 BoPrP、HaPrP、MoPrPおよびHuPrPに共通に結合する、請求項12に記載のmAb。

【請求項14】 クロマトグラフィー担体に結合させた場合に親和カラムクロマトグラフィーにおいてrHuPrPを精製することのできる、請求項1～13のいずれか1項に記載のmAb。

【請求項15】 正常ハムスター脳由来粗膜分画中プロテイナーゼ抵抗性PrP(PrP<sup>sc</sup>)、正常マウス脳由来粗膜分画中PrP<sup>sc</sup>および/またはヒト神経芽細胞由来粗膜分画中PrP<sup>sc</sup>を認識し、且つ免疫沈降法又はウエスタンブロット法を組み合わせて同定できるmAb。

【請求項16】 免疫グロブリンアイソタイプがIgGである、請求項1～15のいずれか1項に記載のmAb。

【請求項17】 請求項1～16のいずれか1項に記載のmAbを産生するハイブリドーマ。

【請求項18】 プリオン遺伝子欠損マウス(PrP<sup>0/0</sup>)をPrPで免疫し、そのマウスから得た脾臓細胞をマウスミエローム細胞と細胞融合せしめることを特徴とする、請求項17に記載のハイブリドーマの製造方法。

【請求項19】 請求項17に記載のハイブリドーマを培養し、所望により抗体を採取することとを特徴とする、請求項1～16のいずれか1項に記載のmAbの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、複数の動物種に由来する正常プリオン蛋白(PrP<sup>c</sup>)及び異常プリオン蛋白(PrP<sup>sc</sup>またはPrP<sup>res</sup>)に共通の高次構造を認識及び結合し、免疫沈降法及び同法を含む何らかの手段で検出同定ができるmAb、同抗体を産生するマウス由来ハイブリドーマ細胞、並びに前記mAbおよびハイブリドーマの製造方法に関する。

【0002】

【背景技術】伝達性海綿状脳症(Transmissible spongiform encephalopathy; TSE)は、脳が海綿状(スポンジ状)を呈し死に至る感染症である。このTSEは、多種の動物に類似の疾患がある。ヒトでは自然発生のCJD、医原的CJD、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)、家族性遺伝的不眠症(FFI)等の遺伝的CJD等の古典的CJDであり、動物ではヒツジのスクレイビー・ウシ海綿状脳症(BSE)、その他反芻動物海綿状脳症、ネコ海綿状脳症(FSE)、ミンク海綿状脳症(MSE)、シカ慢性疲労症候群(CWD)等がこの病気に属す。

【0003】また、英国で大きな問題となっている変異型CJD(vCJD)は、BSEの感染因子が種間バリエーションを超えてヒトに感染し、発病したという推測が有力である。いずれも上記様の特徴的な病理像を呈し、発病死に至った固体の多くに共通してプリオン蛋白(PrP)と命名された蛋白の沈着が認められる。このため、これらの疾患を一括して俗称をプリオン病という。

【0004】プリオン病という俗称の由来は、TSEの感染性病原因子の検索をしていたスタンレー・ブルシナー博士が、この沈着性の蛋白が感染性を持ち且つ病原性を発現する原因物質であろうと推論し、「蛋白性感染因子; Proteinaceous Infectious Particle, prion(プリオン)」と名づけたことによる。ブルシナー博士がこのように推論した理由は、感染性を有する因子を精製したら、最終的にこの蛋白が得られたこと、感染性は、核酸分解操作では消失せず、蛋白変性操作によってのみ消失するという実験結果による。

【0005】このプリオン病の感染性病原因子が、プリオン蛋白であるか否かは未だに明確ではない。プリオン蛋白は、全ての固体が共通に有している遺伝子(Pmp)に由来する正常蛋白が何らかの原因でその高次構造を変えたために生ずる、異常な高次構造となった蛋白(構造異性体)であることが判明している。このためブルシナー博士は、Pmp由来の正常な蛋白をPrP<sup>c</sup>、異常な高次構造を有した蛋白をPrP<sup>sc</sup>と名づけた。PrP<sup>c</sup>とPrP<sup>sc</sup>の蛋白化学的な特徴は、PrP<sup>c</sup>が、その分子内に3ヶ所のαヘリックス部を持つのに対し、PrP<sup>sc</sup>は分子内のαヘリックスが消失しβシート構造に変化しているというものである。

【0006】両者の高次構造の違いは、プロテイナーゼ

K (PK) という蛋白分解酵素に対する感受性の強弱でよく検出される。即ち、PrP<sup>C</sup>はPKに対して感受性でよく分解されるが、PrP<sup>Sc</sup>はPKに対して抵抗性を示し、分解されにくい。このため、しばしばPrP<sup>C</sup>をPrP<sup>Sc</sup>、PrP<sup>C</sup>をPrP<sup>Sc</sup>という名称で表現することもある。ブルシナー博士の主張では、PrP<sup>C</sup>がPrP<sup>Sc</sup>に接触し凝集体を作ることにより、PrP<sup>C</sup>をPrP<sup>Sc</sup>へ変化させるといことがこの蛋白の感染性の実態であるというものであった。従って、PrP<sup>C</sup>が連鎖反応的にPrP<sup>C</sup>をPrP<sup>Sc</sup>へ変化させ、増殖するということがブルシナー仮説の本質である。

【0007】しかし、PrP<sup>C</sup>が実際の動物へ感染して病気を発現させるか否かという問題については実験的な実証がなされていなかった。このため、スイスのワイズマン博士は、「絶対に核酸の入らない条件で調整したPrP<sup>Sc</sup>、最も望ましいのは、試験管内で遺伝子工学的に調整したPrP<sup>Sc</sup>で感染性があるという実証をするべきである」というコメントを提出していた。これに対して、1998年にイギリスのヒル博士らが、「遺伝子工学的手法で人為的に調整したPrP<sup>Sc</sup>は動物に対する感染性を持たなかった」という実験結果を報告した。この報告以降、PrP<sup>C</sup>が動物に対して感染し発病させたという報告はなく、この蛋白が感染性を持つという考え方は1997年当時のような、絶対的な受け入れられはされていない。

【0008】しかし、PrP<sup>C</sup>が感染性を持つか否かという本質に係わる問題とは別に、プリオン病の感染伝播を防ぐという実際的な問題を解決するためには、この病気と特定の関係にある因子を検出・同定し、伝播を防ぐための手段を講じることが必須の事柄である。現在までに世界中の多くの研究者がこのような因子を検索したが、プリオン病と最も相関性が高い因子はPrP<sup>Sc</sup>であるという考え方は一致している。したがって、プリオン病に関する研究を行っている圧倒的多数の研究者の共通した認識では、この病気を最も的確に早期診断するためには、検出感度よく、また特異性高くPrP<sup>Sc</sup>を検出することが必要であるとされている。

【0009】このような目的に用いる検出試薬として、容易に考えうるのはPrP<sup>Sc</sup>の高次構造を特異的に認識結合するmAbである。このようなPrP<sup>Sc</sup>の特異的高次構造のみを認識するmAbについては、従来スイス・チューリッヒ大学のグループによる、わずか一例のみ報告があるが、その抗体は現在では全く用いられていない。現在欧州各国では、英国に端を発したBSE (狂牛病) とそれに関連したvCJDが国を揺るがす大きな問題となっており、欧州共同体 (EU) では生後30ヶ月以上のウシについて、BSEの感染を受けているか否か、検査するよう指令を出している。

【0010】上記のようなPrP<sup>Sc</sup>・特異的高次構造を認識・同定する抗体が不在の現状で、EUでは、この検査に用いる抗体としてPrP (PrP<sup>C</sup>・PrP<sup>Sc</sup>・両アイソフォーム) を認識する抗体 (6H4) を標準抗体とし、PKを作用させてそ

の消化作用に抵抗性を示す蛋白をウェスタンブロット法で同定するという方法 (プリオニクステスト) を一つの方法として指定した。

【0011】

【従来の技術】従来、市販されている抗PrPmAbは、EU (欧州共同体) により指定された6H4および世界で最初に報告された抗PrPmAbである3F4のみである。3F4抗体は、ハムスターPrPとヒトPrPにのみ反応すると称されている。一方6H4抗体は、ウシPrPを始めとしてハムスター・マウス・ヒト等、多くの動物種のPrPを認識反応するとされている。しかし両抗体とも、PrPの一次構造に基づく、特定のアミノ酸配列部位を認識するが、高次構造に基づく立体的な抗原決定基の認識能力に乏しいことが判っている。したがって、この両抗体を用いた検出系では、あらかじめPrPの高次構造を捕らえて精製濃縮することが困難であり、おのずと検出感度に限界がある。

【0012】このため、PrP<sup>Sc</sup>を検出するためには、検体を予めPKで処理した後、SDS及び還元剤 (2-メルカプトエタノール等) 処理で高次構造を壊し、SDSゲル電気泳動-ウェスタンブロットというステップによる方法をとらざるを得ない。異常プリオンとも言われるPrP<sup>Sc</sup>の特徴が高次構造の異常に起因することが明確である以上、このような高次構造の破壊と多量の混入蛋白の存在下におけるPK処理が前提となる操作手順の特徴は、特異的且つ高感度検出を必要とする検査システムの構築のためには大きな欠点となる。このような状況を踏まえ、現在PrP<sup>Sc</sup>の高次構造を認識する抗体を得ることが絶対的に必要な状況であり、多くの研究者がその努力をしているが、PrP<sup>C</sup> (PrP<sup>Sc</sup>) の高次構造のみを認識するmAbは得られるがPrP<sup>C</sup> (PrP<sup>Sc</sup>) の高次構造のみを認識する抗体は得られていないのが現状である。

【0013】TSEのスクリーニング法の確立は、現在急務である。そのため、PrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>Sc</sup>双方に共通の高次構造に基づく抗原決定基を認識反応する抗体により両PrP蛋白を共に精製濃縮し、次いでPK処理によりPrP<sup>C</sup>を消化除去し、消化されずに残るPrP<sup>Sc</sup>を検出するという方法が最善と考えられる。このためには、PrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>Sc</sup>に共通の高次構造に基づく抗原決定基を認識反応する抗体が必要であるが、そのような抗体はまだ報告されていない。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】このように、従来の技術の問題点が主にPrP<sup>Sc</sup>の高次構造に起因する抗原決定基を認識する抗体が得られないことによるものである以上、課題は以下の点に集約される。先ず、(1) 安定して同じ性質のmAbを産生するハイブリドーマ細胞株群を樹立し、(2) その細胞株を半永久的に保存維持すること、その細胞株から得られた抗体が(3) PrP (PrP<sup>C</sup>、PrP<sup>Sc</sup>) の高次構造に起因する抗原決定基を認識し、(4) PrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>Sc</sup> (PrP<sup>Sc</sup>) の精製濃縮を可能とし、

(5) PKの消化作用との併用でPrP<sup>Sc</sup> (PrP<sup>Res</sup>) 蛋白の検出を可能とし、(6) PrP<sup>Res</sup> 蛋白の存在が伝達性海綿状脳症に特異的な現象か否かを判定し、(7) 伝達性海綿状脳症の早期診断を目的とした検査システムの構築に利用し得る抗体であること。

【0015】さらに、近年世界的に大きな問題となっている変異型CJD (vCJD) がBSE因子の種間バリアーを越えたヒトへの感染の可能性が高いこと、及び北米大陸で問題となりつつあるシカ慢性疲労症候群 (chronic wasting disease; CWD) の病原因子がヒトへ感染しvCJDと酷似した症状を呈すること等を考慮し、同抗体が(8) 複数動物種由来のPrPの高次構造を共通に認識し、且つ(9) 上記(4) - (7)の性質を併せ持つこと、が要求される課題である。

【0016】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、複数の動物種に由来する正常プリオン蛋白 (PrP<sup>C</sup>) 及び異常プリオン蛋白 (PrP<sup>Sc</sup>) に共通の高次構造を認識する、プリオン蛋白 (PrP) に対するモノクローナル抗体 (mAb) を提供する。上記のmAbは、好ましくは、少なくとも、リコンビナントウシPrP (r BoPrP)、リコンビナントハムスターPrP (r HaPrP)、リコンビナントマウスPrP (r MoPrP) またはリコンビナントヒトPrP (r HuPrP) に結合する。

【0017】上記mAbはまた、好ましくは、少なくとも、ウシPrP (BoPrP)、ハムスターPrP (HaPrP)、マウスPrP (MoPrP) またはヒトPrP (HuPrP) に結合する。上記mAbは、好ましくは、r BoPrP、r HaPrP、r MoPrPおよびr HuPrPの2以上に結合し、さらに好ましくは、r BoPrP、r HaPrP、r MoPrPおよびr HuPrPに共通に結合する。上記mAbは、好ましくは、少なくとも、BoPrP、HaPrP、MoPrPおよびHuPrPの2以上に結合し、更に好ましくは、BoPrP、HaPrP、MoPrPおよびHuPrPに共通に結合する。

【0018】本発明のmAbは、好ましくは、クロマトグラフィー担体に結合させた場合に親和性クロマトグラフィーにおいてrHuPrPを精製することのできる。本発明のmAbは好ましくは、正常ハムスター脳由来粗膜分画中プロテイナーゼK抵抗性PrP (PrP<sup>Res</sup>)、正常マウス脳由来粗膜分画中PrP<sup>Res</sup> および/またはヒト神経芽細胞由来粗膜分画中PrP<sup>Res</sup> を認識し、且つ免疫沈降法及びウェスタンブロット法を組み合わせて同定できる。本発明の1態様によれば、本発明のmAbは、免疫グロブリンアイソタイプがIgGである。

【0019】本発明は更に、前記のいずれかのmAbを産生するハイブリドーマを提供する。本発明は又、プリオン遺伝子欠損マウス (PrP<sup>0/0</sup>) をPrPで免疫し、そのマウスから得た脾臓細胞をマウスミエロマ細胞と細胞融合せしめることを特徴とする、上記のmAbを産生するハイブリドーマの製造方法を提供する。本発明は更に、上

記のハイブリドーマを培養し、所望により抗体を採取することを特徴とする、前記のmAbの製造方法を提供する。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明のmAbは、複数の動物種に由来する正常のプリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) 及び異常のプリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) を認識することを特徴としている。複数の動物種とは、例えば、ウシ、ハムスター、マウス及びヒトである。即ち、本発明のmAbは、これらの動物種の内、何れかの1動物種由来のプリオンタンパク質 (PrP) を認識し、更に他の動物種由来のPrPを認識する。本発明の好ましい態様によれば、少なくとも上記4動物種すべてからのPrPを認識する。ここで、

「認識する」とは、免疫沈降法又はウェスタンブロット法により検出できる事を意味する。本発明のmAbは、複数の動物種のPrP<sup>C</sup>及びPrP<sup>Sc</sup>由来のPrPに共通の高次構造を認識する事により、上記の性質を現す。

【0021】本発明のmAbは、mAbの生産のための周知の方法により得る事が出来る。即ち、実験動物を所望のPrPにより免疫し、免疫した実験動物から、抗体産生細胞、例えば脾細胞、を採取し、不滅化細胞、例えばミエロマ細胞と融合させてハイブリドーマを得、これを培養して、培養物から目的とするmAbを採取すればよい。免疫原としては、任意の動物由来のPrPを用いる事が出来、例えば、ウシ、ハムスター、マウス、ヒト等のPrPを用いる事が出来、特にウシ由来のPrPが免疫能力が高いため好ましい。

【0022】mAbを産生するハイブリドーマの作製用の実験動物としては、ハイブリドーマの作製のために常用されている動物、例えばマウス、ラットなどを用いる事が出来、特にPrP遺伝子が欠損した動物、特にPrP遺伝子が欠損したノックアウトマウスが好ましい。PrP遺伝子が欠損したノックアウトマウスは、Kawaharaら、Nature, Vol. 400, No. 6741, pp. 225-226 (1999)に記載されており、またこの著者から、特別の制限なく入手可能である。

【0023】本発明のmAbと各種のPrPとの反応性を試験するには、例えば、r BoPrP、r HaPrP、r MoPrP、r HuPrP、BoPrP、HaPrP、MoPrP又はHuPrPを抗原とし、蛋白質を抗原量の約4倍のmAbと、0.25%のトゥーエン20 (Tw20) を及び1%ウシ血清アルブミンを含むダルベッコ磷酸緩衝生理食塩液で混合し、4℃で一晩反応させ、翌日プロテインGセファロースCL4B (PG) 10%懸濁液を10μl加え、さらに4℃で1乃至2時間反応させた後、低速遠心機で遠心洗浄し、沈降蛋白の解析をする。本発明のmAbが複数のPrPを認識することを確認するためには、個々のPrPについての試験をそれぞれ行なって、それらの結果を総合すればよい。

【0024】本発明のmAbが、正常ハムスター脳由来粗膜分画プロテイナーゼK抵抗性PrP (PrP<sup>Res</sup>)、正常マ

ウス脳由来粗膜分画中PrP<sup>Sc</sup>および/またはヒト神経芽細胞由来粗膜分画中PrP<sup>Sc</sup>を認識するか否かを試験するには、ハムスター又はマウス脳由来粗膜分画PrP蛋白、あるいは培養ヒト神経芽細胞粗膜分画中のPrP蛋白を抗原とし、上記と同様の操作を行えばよい。

【0025】本発明のmAbをクロマトグラフィー担体に結合させた親和カラムクロマトグラフィーにおいてrHuPrPを精製するには、精製したmAbを臭化シアンで活性化したセファロースCL4Bに共有結合させたビーズを充填した親和カラムに、例えば、rHuPrPを発現する大腸菌粗溶菌液を通し、ついで0.05%Tw20及び0.5モル/lの食塩を含む20mMトリス緩衝食塩液(TTBS)で十分洗浄した後、3モル/lのチオシアン酸ナトリウム溶液で溶出する。アイソタイプの同定は、被験モノクローナル抗体を、酵素抗体法(ELISA法)により抗マウス免疫グロブリンアイソタイプ抗体と反応させることにより、行なうことが出来る。

【0026】

【実施例】次に、本発明を実施例により更に具体的な説明をする。

#### 実験材料

実施例において使用する実験材料として、rBoPrP、rHaPrP及びrMoPrPはスイスブリオニクス社から購入した。rHuPrPは、ヒト末梢白血球から調製したゲノミックDNAからPmp遺伝子をPCR法により得、プロメガ社Tベクターキットを用いてクローニングして大腸菌で発現させた。rHuPrP蛋白の精製は、QMAフィゲルブルー(QMAフィゲルブルー)及びDEAEフィゲルブルーを用いて精製したモノクローナル抗体を、臭化シアン活性化セファロースCL4Bに共有結合させて抗PrP親和カラムを作製し、rHuPrP蛋白を発現した大腸菌粗溶菌液を通過させることにより行なった。

【0027】6H4及び3F4両mAbは各々ブリオニクス社及びコスモ・バイオ社から購入した。天然ハムスターPrP(nHaPrP)、天然マウスPrP(nMoPrP)は、それぞれハムスター脳、マウス脳由来粗膜分画中のPrP蛋白を用いた。天然ヒトPrP(nHuPrP)は、ヒト培養神経芽細胞由来粗膜分画中のPrP蛋白を用いた。

【0028】実施例1. mAbの作製

(1) 従来、安定して同じ性質のmAbを産生するハイブリドーマ細胞株群を得る技術としては、抗原によりマウスを免疫し、その免疫脾細胞をB細胞系リンパ芽球と融合させた後、HAT選別をすることが公知の技術となっている。この実験では、この技術を利用して、ブリオニクス欠損マウス(Pmp<sup>0/0</sup>)をリコンビナントウシブリオ蛋白(rBoPrP)で免疫し、その免疫脾細胞をB細胞系リンパ芽球であるP3/X63/Aq8・653とポリエチレングリコール4,000で融合させ、HAT(ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン)試薬を用いて選別した。

【0029】ブリオニクス欠損マウス(PrP<sup>0/0</sup>)をr

BoPrPで免疫することにより、動物種に特異的な抗PrP反応を起こさず、複数動物種に共通の交叉反応性抗原決定基を認識する抗体を産生させることができる。得られたHAT抵抗性細胞から、免疫抗原としたrBoPrPを96穴マイクロプレートに付着させたマイクロプレートを用いて、酵素抗体法により抗PrP抗体分泌細胞(ハイブリドーマ)を選別した。ハイブリドーマ細胞のうち、複数動物種PrP蛋白に交叉反応する抗体を産生分泌するものを蛍光ELISA法により選別分離した。

10 【0030】高次構造の認識及びそれへの結合の確認のため、抗原と抗体とを混合し、得られた抗原・抗体複合体(Ag・Ab)にさらにプロテインGセファロースCL4B(PG)を加え、4°Cで1乃至2時間反応させて得られたAg・Ab・PG複合体を低速の遠心操作で遠心洗浄し、免疫沈降抗原とした。免疫沈降した抗原蛋白をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDSPAGE)で分離した後、ウェスタンブロット法(WB)でポリビニリデンフルオリド(PVDF)膜上に付着させた。

20 【0031】ビオチン標識3F4(3F4Bi)あるいはビオチン標識6H4(6H4Bi)を一次抗体、ビオチン標識抗マウスFc(γ)(αMoFcγBi)を二次抗体、アビジン-ビオチン標識アルカリフォスファターゼ(Avd-ALPBi)複合体を三次抗体として、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)及びニトロブルーテトラゾリウム(NBT)により発色させるという、IP-SDSPAGE-WB-EIA(酵素抗体法)という、一連の実験操作を行なった。

30 【0032】こうして、数十株のハイブリドーマを得た。これらのハイブリドーマの内、3株をMouse-Mouse hybridoma 5C8-105、5C8-109及び5C8-113と命名し、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-5466 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央6)に、2001年11月15日に、それぞれFERM-P18601、FERM-P18602、及びFERM-P18603として寄託された。

【0033】樹立した細胞株群は、持続的に安定培養するため、10%ウシ胎児血清を加えたRPMI1640培地にさらに1ng/mlのインターロイキン6(IL6)を加えた培養液を用い、37°C5%CO<sub>2</sub>下で培養した。HAT抵抗性を獲得したハイブリドーマ細胞株群全てを、効率よく凍結保存しまた効率よく生細胞の復帰を得るために、10%ウシ胎児血清加RPMI1640培地に10%BMSOを加えた保存液を用いて液体窒素中に凍結保存した。

【0034】実施例2. mAbの性質の検討(1)

この実施例では、rBoPrP、rHaPrP及びrMoPrP各々を対象抗原とし、本発明のmAb[5C8-113(レーン3)、4B2-56(レーン4)、2F4-67(レーン5)、3F3-03(レーン6)、3F3-06(レーン7)、2F4-67.24(レーン8)及び5C8-105(レーン9)];既知のmAb[6H4(レーン1)及び3F4(レーン2)];並びに抗体なし(レーン11)の、リコンビナントPrP蛋白に対する認識結合性を免疫沈降法で確認した。rBoPrP、rHaPrP及びrMoPrPは

スイス国ブリオニクス社より購入した。その特徴は、細胞からの分泌に関係したシグナル配列を除去し、プリオン蛋白の生物活性および高次構造の構築に大きく関与していると推定されているオクタリピート配列（アミノ酸一文字表示で示すと：PH(Q)GGG(QG)を含むというもの）である。

【0035】これら3種のr PrP蛋白のそれぞれを、前記mAbと混合し、4℃で一晩反応させた後、PGを加えさらに4℃で1乃至2時間反応させ、TTBSで洗浄し、SDS 10 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で沈降蛋白抗原の種類を分離し、次いでウェスタンブロット法(WB)でPVDF膜に付着させ、市販の3F4mAbまたは6H4mAbを一次プローブ、ヤギ抗マウスIgG抗体を二次プローブとしてアルカリフォスファターゼによる酵素抗体法で発色させた。ここで、3種のリコンビナントPrP抗原と前記mAbとが反応すれば、その後の一連の操作により染色バンドとして検出され、前記mAbの、最初に混合した抗原(ここでは3種のr PrP)との特異的反応性が確認される。結果を図1及び図2に示す。

【0036】図1は前記mAb群とr BoPrPとの反応性を免疫沈降法で比較検討したものである。前記mAb群を構成する各mAbは、免疫沈降法では6H4及び3F4の両mAbに比べ、同等またはそれ以上の反応性が認められる。この事実は、前記mAb群がPrP蛋白本来の持つ高次構造を認識する能力において、既存の6H4及び3F4 mAbより優れていることを示している。また、図2aは図1と同様の免疫沈降実験をr MoPrPを対象抗原、図2bはr HaPrPを対象抗原として行った結果である。図2のa及びbにおけるレーンの割り振りは、図1の場合と同じである。図2aで示される様に、前記mAb群はいずれの抗体も、用いたr MoPrPに対して6H4および3F4 mAbと同等以上の反応性を持つことがわかる。

【0037】さらに、5C8-113、5C8-105 両mAbを用いた免疫沈降実験では、分子量が約52乃至65k Daの移動度のところに強く染色されたバンドが認められる(レーン3およびレーン9; 矢印)。この分子重量位置は、r MoPrPの凝集体(おそらく二量体)の分子重量位置に相当する。PrPは膜蛋白で疎水性が高いため、分子が凝集しやすいという特徴を持つ。生体の細胞膜上にある天然PrP(nPrP)も、その本来の存在状態は二量体となっておりと推定されており、その意味でこの分子重量位置の凝集蛋白に反応し沈降する性質を持つ5C8シリーズのmAbは高次構造を認識する能力が一段と高いことが推定される。

【0038】図2bは、r HaPrPを対象抗原として免疫沈降実験をしたものである。r BoPrPおよびr MoPrPを対象抗原とした場合と同様、6H4及び3F4 mAbと同程度あるいはそれ以上の沈降バンドが認められる。さらに、5C8-113(レーン3)及び5C8-105(レーン9)ではやはり凝集体に相当する分子重量位置に染色バンドが認められ、5C8シリーズmAbが特に広範囲の動物種のr PrPの、高次構造を

認識沈降することが示される。

【0039】この5C8シリーズmAbが、天然PrP(nPrP)の高次構造を強く認識することについて、確認の意味で示したのが図2cである。図2cは、ハムスター脳乳剤(ホモジェネート)から調製した粗細胞膜分画を対象抗原として、当該mAb群の一部で免疫沈降反応をさせたものである。この図から明らかなように、既存の6H4および3F4 mAb並びに5C8シリーズmAb以外のmAbを使用した場合には全く沈降蛋白のバンドが認められないのに対して、5C8-113(レーン3)及び5C8-105(レーン9)を使用した場合にはPrPの凝集体に相当する分子重量位置の蛋白バンドが認められる(矢印)。これは、これらの5C8シリーズmAbがHaPrPの高次構造に由来する抗原決定基を認識するという意味のみでなく、5C8シリーズmAbがnPrP分子の高次構造に由来する抗原決定基を強く認識することを示している。

#### 【0040】実施例3. mAbの性質の検討(2)

この実施例は、本発明のmAb 5C8-105、5C8-109、5C8-113の、r HuPrPに対する反応性を免疫沈降法で確認するものである。r HuPrPは、ヒト末梢白血球由来ゲノミックDNAから、ヒトPrP遺伝子部分を遺伝子クローニング法によりクローニングし、大腸菌で発現させたものである。このr HuPrPの特徴は、本来のPrP蛋白のシグナル配列部分を欠失させ、その代わりにビオチン結合部位(Biotag)をつけたものである。このような構造にすることにより、PrP蛋白の本来の構造を保ったまま、ビオチンという、高感度検出に必要な標識がつけられたことになる。

【0041】図3はこのようにして作製したヒトPrP遺伝子クローンを大腸菌に発現させたもののウェスタンブロットパターンである。ここでは、クローニングした遺伝子を組み込んだ大腸菌の菌体を直接SDSサンプルバッファで溶菌し、r HuPrP発現の多少を解析したものである。レーン1: クローン9、レーン2: クローン11、レーン3: クローン17、レーン4: クローン18、レーン5: クローン19、レーン6: クローン29、レーン7: クローン31、レーン8: クローン34、レーン9: クローン37、レーン10: クローン43、及びレーン11: クローン44である。クローン11、18、19、29及び44がr HuPrPをよく発現していることがわかる(図中、約35~37kDaの矢印部位の染色バンド)が、その中でクローン11およびクローン44が特に発現量が多いことがわかる。したがって、これ以後はクローン44を用いてr HuPrPの作製を行うこととした。

【0042】図4は、培養した大腸菌クローン44を溶菌バッファで溶菌した遠心上清を対象抗原溶液とし、本発明のmAbである5C8-105、5C8-109及び5C8-113、並びに既知mAbである3F4及び6H4(市販mAb)を対照として、r HuPrPに対する結合性を免疫沈降法で検討した結果である。また、r HuPrPに対する結合が特異的結合であること



を示すため、結合性の低い別クローンのmAb、2F4-11、2F4-18・11を陰性対照とした。なお、レーンの割付は、レーン1：粗溶菌上清、レーン2：2F4-18・11、レーン3：PBS、レーン4：MoIgG、レーン5：2F4-11、レーン6：5C8-109、レーン7：5C8-113、レーン8：5C8-105、レーン9：3F4、及びレーン10：6H4である。粗サンプルでrHuPrPの分子量位置に相当する蛋白バンドがかすかに検出できる(矢印)。これに対して、市販の6H4及び3F4両mAb並びに本発明の5C8シリーズのmAbである5C8-105、5C8-109及び5C8-113ではかなり明瞭な蛋白バンドとして検出することが可能である(レーン6~10)。したがって、5C8シリーズの3種のmAbは、rHuPrPに対しても免疫沈降法により認識結合することが確認された。

#### 【0043】実施例4. mAbの性質の検討(3)

この実施例は、実施例2及び実施例3で確認した本発明のmAbの、リコンビナントPrPに対する免疫沈降法による結合確認と同様の認識結合性を、nPrPについて確認するものである。各々ハムスター及びマウスの脳膜分画(各々HaCMF、MoCMF)及びヒト培養神経芽細胞膜分画(HuCMF)中のPrP蛋白を対象抗原として用いた。HaCMF、MoCMF又はHuCMFを対象抗原として、実施例2及び実施例3に記載したのと同様に免疫沈降法を行った結果を図5に示す。

【0044】図5において、パネルAがHaCMF、パネルBがMoCMF、パネルCがHuCMFを対象抗原として、レーン1：抗体による免疫沈降無し、レーン2：5C8-105、レーン3：5C8-109及びレーン4：5C8-113の3種のmAb、並びに対照として、レーン5：市販の3F4mAb、及びレーン6：マウスIgG(陰性対照)、による免疫沈降法-ウェスタンブロット法による解析を行ったものである。いずれのパネルもレーン5が市販の3F4によるものであるが、3F4ではどの膜分画を用いても明確な蛋白バンドが認められないのに対して、5C8シリーズのmAbでは分子量が約52kDa及び24kDa位置に明確な蛋白バンドが認められ、MoCMFを対象抗原とした場合には、更にこの両分子量位置に加えて35乃至37kDa位置にやや薄い蛋白染色バンドが認められる(矢印)。

【0045】この図から明らかなように、nPrPに対しては本発明のmAbの免疫沈降における反応性は明らかに市販の3F4mAbよりも優れていることがわかる。35乃至37kDa位置の蛋白バンドは、MoCMFのみではなく、HaCMF又はHuCMFを対象抗原とした場合にも認められることが分かった(後記実施例6の図7~図11)、HuCMFを含めて、ここで対象抗原として用いているCMF全てに存在し、本発明のいずれのmAbも認識し、結合できると容易に推測される。HaCMF又はHuCMFを用いた場合に、この35乃至37kDa蛋白が認められなかった理由は、用いた抗原量の問題である推定される。さらに、HaPrP、MoPrP及びHuPrPのいずれに対しても同じように反応するということは、この3種のmAbが、ハムスター、マウス及びヒトのPrP何

れにも共通に存在する抗原決定基に反応していることを示している。

【0046】ウェスタンブロット法では反応性が非常に弱く、免疫沈降法によって明確な反応性が認められるという、実施例2~4で示された事実は、これら本発明のmAbがアミノ酸配列に基づく一次構造を認識しているのではなく、立体的な高次構造に基づく抗原性を認識反応していることを示している。しかもこの高次構造に基づく抗原性は、リコンビナント分子、天然分子を問わず、共通に存在する抗原活性である。ここから類推して、これら本発明のmAbは、BoPrPにも同様に免疫沈降法によって反応するであろうと思われる。

#### 【0047】実施例5. mAbの性質の検討(4)

本発明のmAbのうち、5C8-113をスキッドマウスの腹水型として大量に作製し、DEAEアフィゲルブルー及びQアフィゲルブルーカラムクロマトグラフィーによって精製したIgGを、ブロムシアンで活性化したセファロースCL4Bに結合させたビーズを充填した親和カラムを用いてrHuPrPを精製した結果を図6のA及びBに示す。図6のAでは、大腸菌で発現させたrHuPrP粗分画(溶菌した大腸菌から菌体残渣を遠心操作で取り除いたもの)を出発資料とし、上記のカラムに通すことにより精製したものの電気泳動パターンである。

【0048】左側のレーンから、レーン1：粗分画、レーン2：カラム素通り分画、レーン3：カラム洗浄分画、及びレーン4：カラム溶出分画の順であるが、粗分画から始まり洗浄分画まで、いかに混入蛋白が多いか判るが、このような混入蛋白の多い粗分画が、このカラムを一回通すだけで右端溶出分画のようにrHuPrP蛋白バンドがはっきりと浮き上がるように精製できることがわかる(矢印)。図6Bは、このように精製したrHuPrP蛋白の不純混入蛋白がどの程度あるかを、高感度染色法で検討したものである。レーンの割り付けは、図6Aの場合と同じであり、レーン5のカラム溶出分画は10倍希釈である。

【0049】矢印で示したrHuPrP分子と、恐らく大腸菌菌体内から出た蛋白分解酵素による分解を受けたと思われる分子(\*印)と同時に、分子量位置20kDaの、大腸菌自体が作る蛋白の混入が明らかである(+印)。したがって、5C8-113精製グロブリンを結合させたセファロースCL4Bによるカラム一段では完全に精製することはできないようであるが、一段のカラム操作で粗分画から90%乃至それ以上の精製を行うことが可能であると思われる。

#### 【0050】実施例6. mAbの性質の検討(5)

この実施例では、HaCMF、MoCMF及びHuCMFを対象抗原とし、mAbとして5C8-105、5C8-109及び5C8-113を用い、これらから得た免疫沈降物のプロテイナーゼK抵抗性を見たものである。そもそも、異常型PrP(PrP<sup>Sc</sup>)はプロテイナーゼK(PK)抵抗性を示すことから、PKに対する感



受性の強弱によって、正常型PrP (PrP<sup>C</sup>) と区別する意味でPrP<sup>Sc</sup> という実務的な別称で示されることがしばしばある。しかし、近年PKに対して抵抗性を示すが、明らかに感染性はないという分子の存在が認められてきた。

【0051】これは、感染因子の実体と想定されてきたPrP<sup>Sc</sup> が、その概念とは裏腹に、この蛋白の感染性が証明されていないという事実とあいまって、実際の感染因子の実体であるか否かという疑義が生じ始めているところである。さらに、病気の初期にPrP<sup>Sc</sup> 蛋白が、感染因子(と推定されている)種となるPrP<sup>Sc</sup> の作用なしに、独自にPrP<sup>C</sup> との平衡状態として成立しているのではないかという考え方も示されている。このような状況で、ここでPrP<sup>Sc</sup> が感染因子の実体であるか否かを論ずることはできないが、少なくとも、感染を受けていない正常の細胞膜上にPrP<sup>Sc</sup> が存在する可能性が疑われるようになってきたことは事実である。

【0052】先ず、図7は、HaCMFを対象抗原とし、本発明のmAbのうち5C8-105、5C8-109及び5C8-113を用いて免疫沈降をした沈降物中にPK抵抗性の蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)が存在するか否かを検討したものである。免疫沈降に用いた抗体は、グループ1: 5C8-105、グループ2: 5C8-109、及びグループ3: 5C8-113で、各グループとも、レーンa: HaCMFを先ずPK処理し、その後免疫沈降をしたもの、b: HaCMFを先ず免疫沈降し、十分洗浄後PK処理をしたもの、及びc: HaCMFをPK処理せずに、免疫沈降のみおこなったものである。染色は、一次抗体として3F4B1を用い、二次試薬としてアビジンを用い、三次試薬としてビオチン標識ALPを用い、NBT-BCIPシステムで発色した。

【0053】図8は、HaCMF、MoCMF及びHuCMFを対象抗原として用い、本発明のmAbとして5C8-105、5C8-109及び5C8-113を用いて免疫沈降した沈降物中に、PK抵抗性PrPが存在するか否かを検討したものである。免疫沈降に用いた対象抗原は、パネルA: HaCMF、パネルB: MoCMF、及びパネルC: HuCMFであり、免疫沈降に用いたmAbのグループ、及び電気泳動レーンは図7の説明と同じである。なお、上記のプロテイナーゼK (PK) 処理は、ダルベッコ磷酸緩衝生理食塩液中でプロテイナーゼKの濃度を25 µg/mlとし、37°C 30分の条件でインキュベートしてPrP蛋白を消化処理することにより行なった。

【0054】図9は、HaCMFを対象抗原とし、本発明のmAbとして、5C8-105 (グループ1)、5C8-109 (グループ2) 及び5C8-113 (グループ3) を用いて免疫沈降し、その後沈降物をPK処理した場合に得られる蛋白の染色の程度を増強し、PrP<sup>Sc</sup> 蛋白の分子量位置による解析を容易にしたものである。パネルAは、ウエスタンブロット (WB) をしたPVDF膜上に付着した蛋白バンドを、一次抗体として3F4B1を用い、二次試薬としてアビジンを用い、三次試薬としてビオチン標識ALPを用い、NBT-BCIPで発色させる、通常のシステムである。パネルBはPrP蛋白の染色の度合いを増強したもので、一次抗体としての3F

4B1の後に二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウスIgG (GAMIGGBi) を作用させ、その後アビジン-ALPBiを結合させ、NBT-BCIPシステムで発色させたものである。

【0055】図10図は、HaCMF (パネルA) 及びMoCMF (パネルB) を対象抗原とし、5C8-113mAbを用いて免疫沈降したPrP<sup>Sc</sup> のPK抵抗性の程度を、PK処理時間を変えて検討したものである。パネルA及びパネルBとも、レーン1: PK処理なし、レーン2: PK 25 µg/ml 37°C 30分処理、レーン3: 60分処理、レーン4: 90分処理、レーン5: 120分処理し、PrP蛋白バンドの染色は、図9Bと同様の方法で、染色増強をした。

【0056】図11は、HaCMF (パネルA) 及びMoCMF (パネルB) を対象抗原とし、5C8-113mAbを用いて免疫沈降したPrP<sup>Sc</sup> のPK抵抗性の程度を、処理するPKの濃度を変えて検討したものである。パネルA及びパネルBとも、レーン1: PK処理なし、レーン2: PK 25 µg/ml 37°C 30分処理、レーン3: PK 50 µg/ml 37°C 30分処理、レーン4: PK 100 µg/ml 37°C 30分処理し、PrP蛋白の染色は、図9B及び図10と同様の方法で、染色増強を行った。

【0057】図7から明らかなごとく、免疫沈降する前にPK処理した場合 (レーンb) はもちろん、洗浄した後にPK処理をしても (レーンa) PK抵抗性PrP蛋白が残ることがわかる (矢印)。そこで、このPK処理をした後に残存するPrP蛋白のPK抵抗性の程度はどの程度であるのか、より詳細に解析するために、ウエスタンブロットにおける蛋白バンドの増強を行ない、PVDF膜に付着した蛋白バンドを明瞭に示したものが図9のBである。図9のAは、図7及び図8のAと同様に、HaCMFを対象抗原とし、Ag・Ab・PG複合体を十分に洗浄した後、PK処理をしたもの (PK+レーン) とPK処理をしないもの (PK-レーン) に分けてウエスタンブロットをし、一次抗体3F4B1とアビジン-ビオチンALPで発色させたものである。

【0058】一方、図9のBは、Ag・Ab・PG複合体を遠心操作で十分に洗浄した後PK処理をし、ウエスタンブロットしたPVDF膜付着蛋白を、一次抗体3F4B1を作用させた後に、二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウスIgG (GAMIGGBi) を新たに加えて作用させ、染色の増強を図ったものである。染色の増強効果は明らかであり、52-60 kDa (二本)、34-36 kDa (二本、34 kDa主体)、及び24 kDaの3グループのPK抵抗性蛋白バンドが認められる (矢印)。

【0059】図10は、HaCMF及びMoCMFを用いて免疫沈降したAg・Ab・PG複合体を、同濃度のPKを用いて作用時間を変え、PK抵抗性の程度を検討したものである。レーンは、1. PK処理なし、2. PK処理30分、3. PK処理60分、4. PK処理90分、5. PK処理120分である。図から見られるのは、Ha、Mo両CMFとも52 kDa蛋白は処理時間の長さ に比例して分解されるが、34 kDa蛋白は、HaCMF中のものでは90分処理まで、MoCMF中のもものでは120分まで、PK

による消化作用をほとんど受けないということがわかる(矢印)。120分処理をすると、HaCMF中PrPはかなり消化されるが、MoCMF中のものはわずかに消化されるのみである。

【0060】次に、HaCMFを対象抗原として得たAq・Ab・PG複合体及びMoCMFを対象抗原として得たAq・Ab・PG複合体に対してPK濃度を変えて、抵抗性の程度を検討したのが図11である。パネルは図10と同様に、AがHaCMFを対象抗原とした場合、BがMoCMFを対象抗原とした場合である。レーン1はPK処理なし、レーン2はPK 25  $\mu$ g/ml、レーン3はPK 50  $\mu$ g/ml、レーン4はPK 100  $\mu$ g/mlである。HaCMFを対象抗原とした場合では、PK 100  $\mu$ g/mlまで34k Daおよび24k Da蛋白のPK抵抗性が明らかである(矢印)。

【0061】MoCMFを対象抗原とした場合では、PK 50  $\mu$ g/mlまでのPKの消化作用に対して34k Da及び24k Da蛋白が抵抗性を示す。以上図8乃至図11は、感染を受けていない正常なハムスター及びマウスあるいはヒト神経芽細胞の膜上にPKの消化作用に対して抵抗性を示す蛋白があることを示すと同時に、当該mAbがその蛋白と反応し免疫複合体を作ることが明らかである。

【0062】本発明のmAbのアイソタイプは、シングルラジアルイムノディフュージョン(SRID)法、及び抗マウスアイソタイプ抗体を用いたELISA法で確認でき、また、図9乃至図11におけるAMiGGBiによるウェスタンブロットバンドの明瞭な染色増強が認められることから明らかである。図8乃至図11に示される、これらPKの消化作用に抵抗性を示す蛋白は、染色に用いている一次抗体の3F4 mAbの反応特異性から、PrP<sup>Sc</sup>であることが明らかである。したがって、図8乃至図11は、非感染ハムスター及びマウス脳由来粗膜分画あるいはヒト培養神経芽細胞由来粗膜分画にPrP<sup>Sc</sup>があることを強く示していると同時に、本発明のmAbがこれらのPrP<sup>Sc</sup>を認識結合して免疫複合体を形成できることを示している。

#### 【0063】

##### 【発明の効果】効果1

本発明のmAbは、ウェスタンブロット法ではPrP蛋白を検出することがかなり困難であるが免疫沈降法では容易に検出することができる。ウェスタンブロット法は、先ず検体をSDSおよび2メルカプトエタノール(2ME)あるいはジチオスレイトール(DTT)が入っている、蛋白変性を目的とした緩衝液に溶解し、さらに100°C10分という、加熱処理で強力な蛋白変性を行った上で電気泳動解析をする。このため、検体蛋白は高次構造が完全に破壊され、一本鎖ポリペプチドとして解析されることになる。

【0064】したがって、このような状態で電気泳動された蛋白を検出する抗体は、蛋白を構成しているアミノ酸そのものあるいは3乃至4個のアミノ酸配列を認識結合することになる。これに対して、免疫沈降法では、蛋白

がその高次構造を保った状態の、高次構造に起因する立体的な抗原決定基を認識結合する。したがって、当該mAbがPrP蛋白の高次構造を認識結合していることは明らかである(課題(3)の克服)。

【0065】さらに当該mAbは、r PrP分子に対しては既存mAbである6H4及び3F4とあまり変わらない結合性を示すのみであるが、粗膜分画(CMF)中の天然PrP分子に対しては、既存の6H4及び3F4 mAbよりも反応性に優れている。これは、既存のmAbである6H4及び3F4では得られない特徴であり、高次構造の異常が問題となっているPrP蛋白を認識結合することが必要な抗体としては、大きな効果があると言える。

#### 【0066】効果2

PrP蛋白は、構造異性(isoform)を示すことにより正常蛋白と区別される。この大きな特徴がPKに対する感受性の違いとして検出される。このため、伝達性海綿状脳症に罹患しているか否かを同定する生化学的な手段は、PK抵抗性を獲得したPrP蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)の存在を確認することが最も確実とされてきた。しかし、従来PrP<sup>Sc</sup>を確認することは、既に罹患して末期的症状を示している、あるいは死亡した個体の脳、リンパ組織等、PrP<sup>Sc</sup>の蓄積が多い組織を対象に行ってきた。

【0067】この理由は、第一にPrP<sup>Sc</sup>の存在量が、蓄積した組織以外では非常に少ないこと、第二に、検出するために用いる抗体がその特徴的な高次構造を認識できるものではなく、アミノ酸配列に基づく一次構造のみを主に認識結合するため、PrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>とを区別するために行うPK処理の時期を、精製濃縮していない粗検体の段階で行わざるを得なかったという現実がある。したがって、PK処理前に精製濃縮ができないために、1) PKの作用効率が悪い、2) 必然的に低濃度のPrP<sup>Sc</sup>は検出不能となる、という不利点があった。

【0068】課題(4)の、「精製濃縮を可能とする」という意味は、このように低濃度PrP<sup>Sc</sup>を検出するために必須の要件である。当該mAbは免疫沈降法により、粗検体からのPrP蛋白の精製濃縮が可能であることが明らかであり、さらに、ブロムシアン活性化セファロースCL4Bに結合させた形で、カラムクロマトグラフィーによりPrPを精製することもできる。これは、従来の既存mAbでは得られない大きな利点であり、低濃度のPrP蛋白を濃縮検出することを可能とする大きな効果がある。

#### 【0069】効果3

前述のように、伝達性海綿状脳症を生化学的に検出し早期診断を行うためには、早期に低濃度のPrP<sup>Sc</sup>蛋白を効率よく検出しなくてはならない。PrP<sup>Sc</sup>の高次構造のみを特異的に認識できる抗体の存在が非常に疑われる現在では、PrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>とを双方とも認識濃縮して、PKを作用させて抵抗性を示す蛋白を検出同定することが必要である。このため、「PKの消化作用との併用で」ということが重要な意味を持つ(課題(5))。本発明のmAbは

免疫沈降法により精製濃縮した後で、PKを作用させPrP<sup>Sc</sup>を検出同定することが可能である。

#### 【0070】効果4

PrP<sup>Sc</sup>蛋白は、伝達性海綿状脳症の最も確実な生化学的マーカーと考えられてきた。これは、この病気に特異的に関連した生化学的マーカーを検索した結果得られてきた一般的な了解事項である。しかし最近、最初のPrP<sup>Sc</sup>がどのように生ずるのかという疑問、及びPrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>とは相互に変換可能であるという試験管内実験とを根拠に、PrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>とは、病気の初期段階で細胞膜上で動的平衡状態を形成しているという可能性が仮説として提出されるようになってきている。

【0071】これをさらに一段踏み込むと、感染因子の侵襲を受けていなくとも（つまり感染していなくとも）PrP蛋白の両アイソタイプは平衡状態にある可能性が疑われるという結果になる。このような場合、PrP<sup>Sc</sup>の存在が海綿状脳症の発症に特異的な現象か否かという、従来当然のように仮定されてきた事柄に対して疑問を投げかけるという結果となる（課題（6））。本発明のmAbは、HaCMF、MoCMF、HuCMFという、非感染動物脳由来膜分画、あるいは培養神経芽細胞由来膜分画中にPrP<sup>Sc</sup>が存在する可能性を強く示唆する結果を示すことができ、従来のmAbでは全く得られない効果である。

#### 【0072】効果5

効果1乃至効果4に示した特徴は、本発明のmAbが免疫沈降法を始めとするPrP蛋白の高次構造を認識する何らかの方法とPKの消化作用との併用で、早期診断の目的でPrP<sup>Sc</sup>蛋白を検出同定する検査システムの構築に利用しうる抗体であることを示している（課題7）。

#### 【0073】効果6

本発明のmAbは、rBoPrP、rHaPrP、rMoPrP、rHuPrP、HaCMF中のnHaPrP、MoCMF中のnMoPrP、及び培養ヒト神経芽細胞由来HuCMF中のnHuPrPを共通に認識結合する。これはウシ、ハムスター、マウス及びヒト以外の複数の動物種に由来するPrP蛋白に対して共通に認識反応することを十分期待させる結果である。以上、効果1乃至効果6は、本発明が解決しようとする課題（1）乃至課題（6）を十分解決しているとみられ、従来の既存mAbにはない大きな特徴であるといえる。

#### 【0074】符号の説明

なお、この明細書において、下記の略号は、下記のいみを有する。

1. IP; 免疫沈降法
2. WB; ウェスタンブロット法
3. mAb; モノクローナル抗体
4. PK; プロテイナーゼK
5. rPrP、rBoPrP、rHaPrP、rMoPrP、rHuPrP、; 組換えプリオン蛋白、組換えウシプリオン蛋白、組換えハムスタープリオン蛋白、組換えマウスプリオン蛋白、組換えヒトプリオン蛋白

【0075】6. nPrP、nHaPrP、nMoPrP、nHuPrP、nBoPrP; 天然プリオン蛋白、天然ハムスタープリオン蛋白、天然マウスプリオン蛋白、天然ヒトプリオン蛋白、天然ウシプリオン蛋白

7. SDS-PAGE; SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動
8. PVDF; ポリビニリデンフルオリド
9. BCIP; 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル磷酸
10. NBT; ニトロブルーテトラゾリウム

11. CMF; 粗膜分画

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のmAbおよび既知のmAbと、rBoPrPとの免疫沈降法における免疫反応性を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。

【図2】図2において、aは、本発明のmAbおよび既知のmAbと、rMoPrPとの免疫沈降法における免疫反応性を示す電気泳動図であり、bは、本発明のmAbおよび既知のmAbと、rHaPrPとの免疫沈降法における免疫反応性を示す電気泳動図であり、そして、cは、発明のmAbおよび既知のmAbと、HaCMF中のPrPとの免疫沈降法における免疫反応性を示す電気泳動図であり、いずれも図面代用写真である。

【図3】図3は、HuPrP遺伝子を組み込んだ大腸菌の複数のクローンのrHuPrP蛋白発現量を表す電気泳動図であり、図面代用写真である。

【図4】図4は、本発明のmAb及び既知mAbと、rHuPrPとの免疫沈降法における免疫反応性を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。

【図5】図5は、本発明のmAbである5C8-105、5C8-109及び5C8-113と、nHaPrP（パネルA）、nMoPrP（パネルB）又はnHuPrP（パネルC）との免疫沈降法における免疫反応性を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。

【図6】図6は、A及びBともに、本発明のmAbである5C8-113をセファロースCL4Bに結合させた親和性カラムにより、大腸菌からのrHuPrP含有粗溶液を精製した過程を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。

【図7】図7は、本発明の3種類のmAb（パネル1、2及び3）と、HaCMF中のPrPとの間の免疫沈降物のプロテイナーゼK（PK）に対する抵抗性を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。

【図8】図8は、本発明の3種類のmAb（レーン群1、2及び3）と、HaCMF（パネルA）、HaCMF（パネルB）又はHuCMF（パネルC）との免疫沈降物のPKに対する抵抗性を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。

【図9】図9本発明の3種類のmAb（グループ1、2及び3）と、HaCMF中のPrP<sup>Sc</sup>との免疫沈降物のPKに対する抵抗性を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。パネルA及びBは染色方法が異なる。

【図10】図10は、本発明のmAbである5C8-113と、HaCMF

F (パネルA) 又はMoCMF (パネルB) との免疫沈降物のPK抵抗性を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。レーン1～5は、PKを作用させた時間の違いを示す。

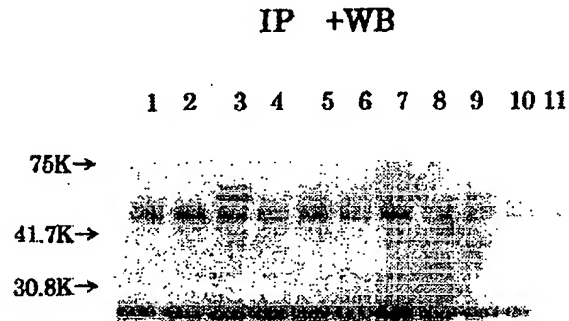
\* F中のPrP<sup>Sc</sup>又はMoCMF中のPrP<sup>Sc</sup>との免疫沈降物のPKに対する抵抗性を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。レーン1～4は、作用させたPKの量の違いを示す。

【図11】図11は、本発明のmAbである5C8-113と、HaCM\*

【図1】

図1

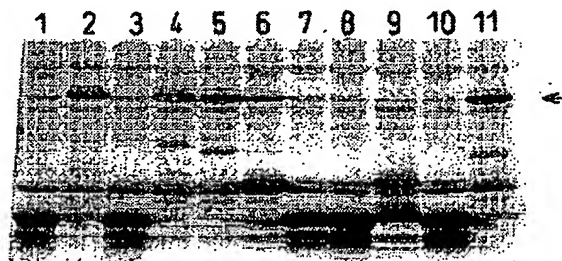
当該mAbのrBoPrPに対する免疫沈降法による結合性の検討



【図3】

図3

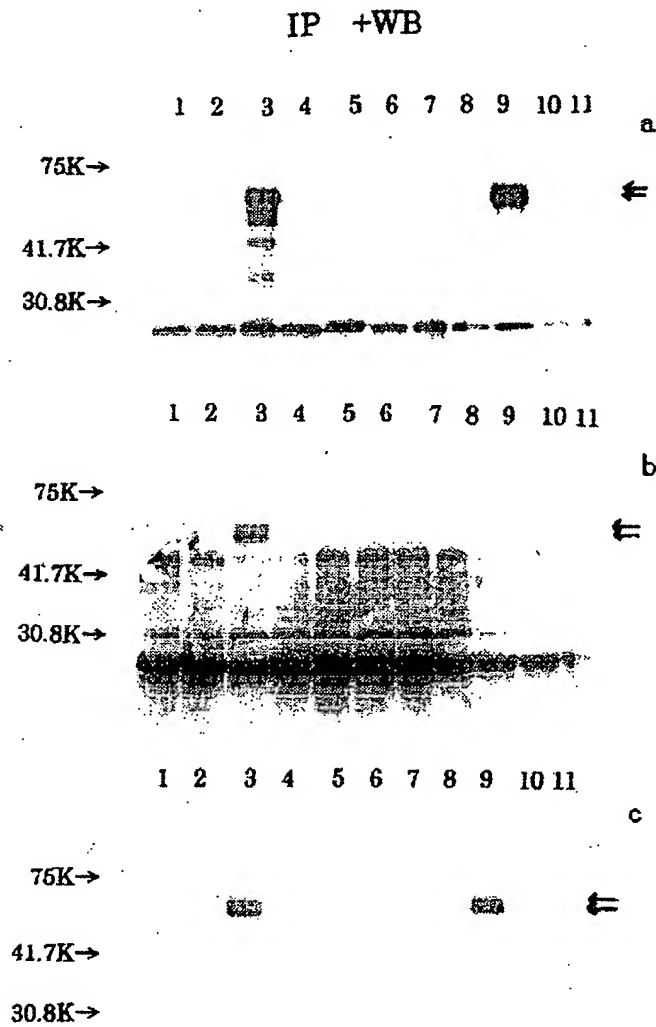
HuPrP遺伝子を組み込んだ大腸菌クローンの  
rHuPrP蛋白発現量の比較



【図2】

図2

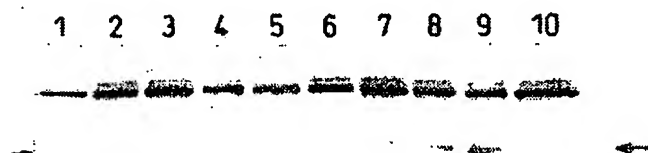
当該mAbのrMoPrP、rHaPrP、HaCMF中PrP蛋白との、  
免疫沈降法による結合性の検討



【図4】

図4

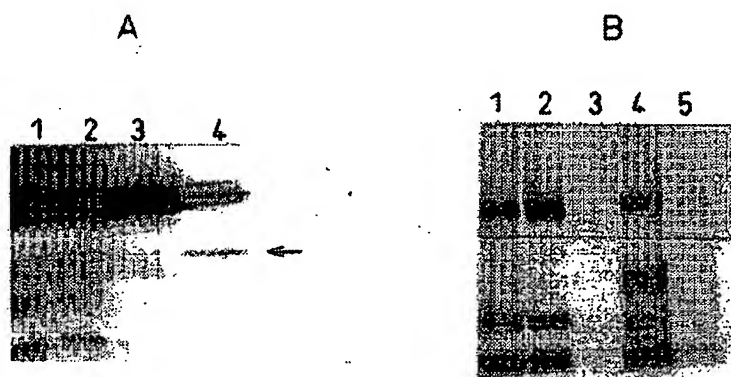
当該mAbのrHuPrPに対する免疫沈降法による結合性の検討



【図6】

5C8-113 IgG結合親和カラムを用いたrHuPrPの精製  
 A；粗溶菌液の5C8-113親和カラムによる精製各分画のWBによる解析  
 B；精製各ステップの、構成蛋白の解析

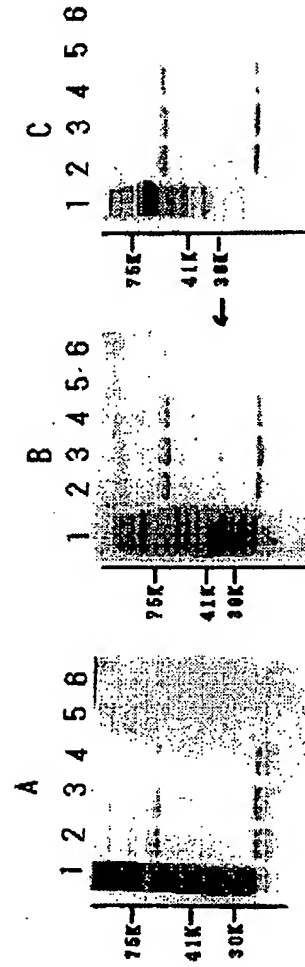
図6



【図5】

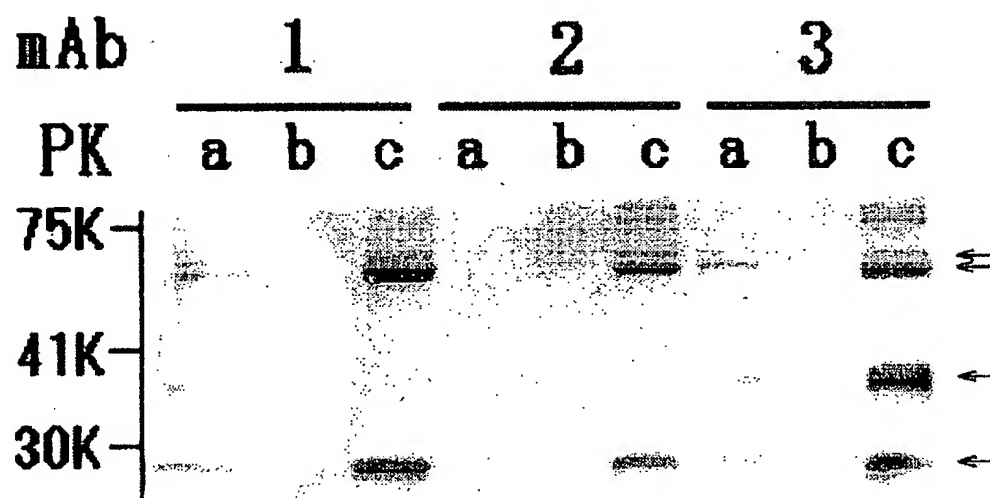
図5

5C8-105、5C8-109、5C8-113mAbのHaPrP、MoPrP、HuPrP  
に対する結合性の、免疫沈降法による検討





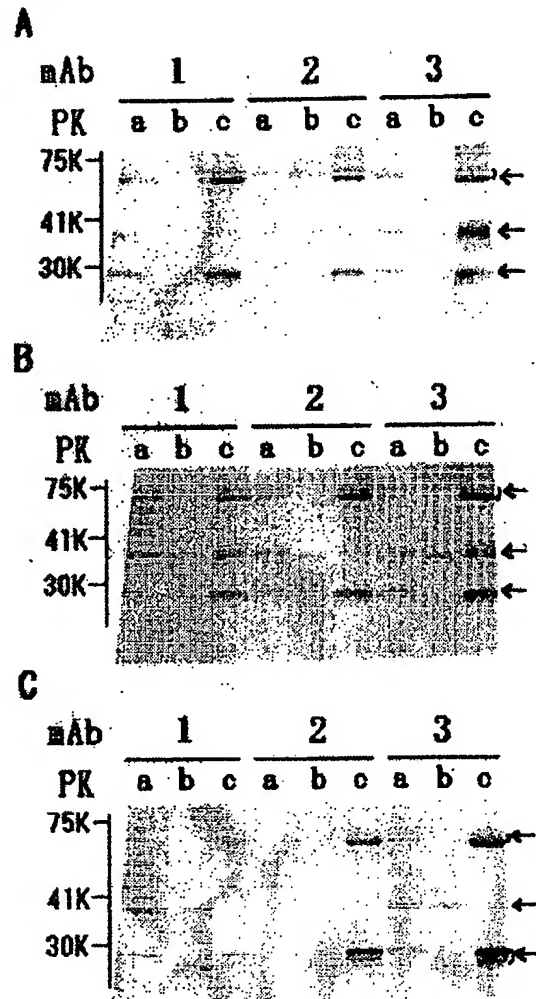
【図7】

HaCMF 中 P<sub>r</sub>P 蛋白の PK 抵抗性分画の検索図  
7

【図8】

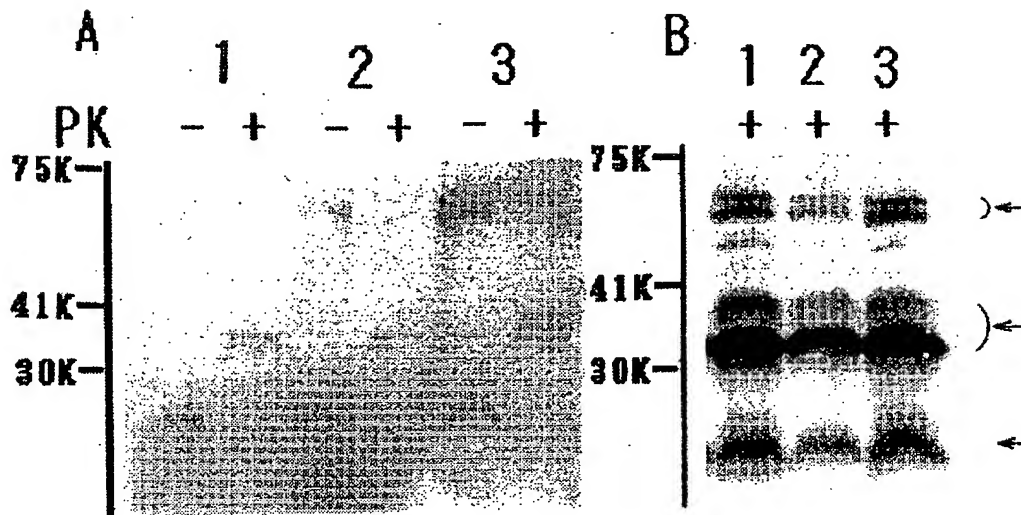
図8

HaCMF、MoCMF、HuCMF中PrP蛋白のPK抵抗性分画の検索



【図9】

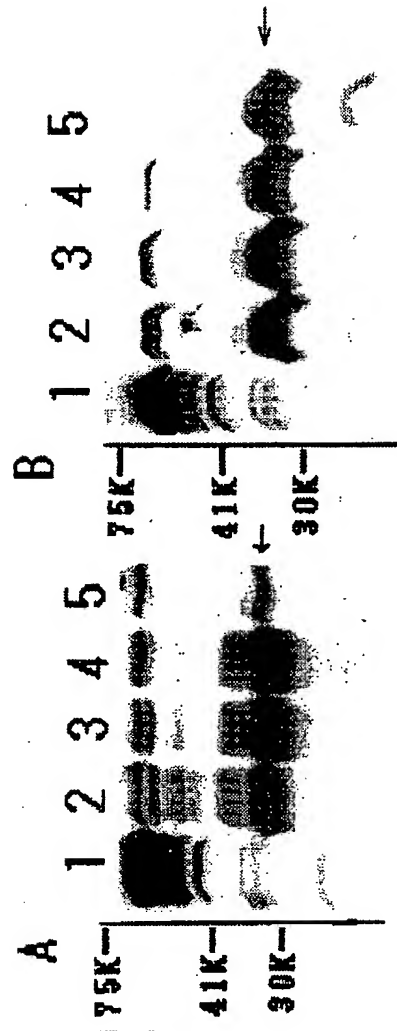
HaCMF中のPrPres蛋白のW.B膜付着状態における染色増強

図  
9

【図10】

図 10

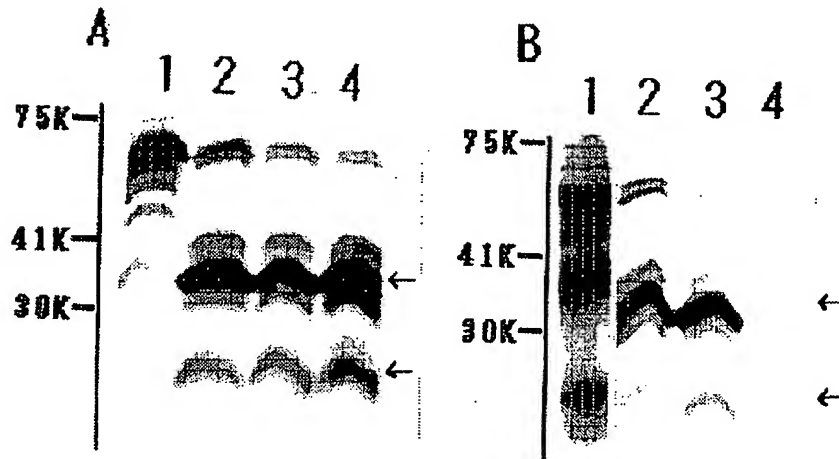
HaCMF中PrPres及びMoCMF中PrPres蛋白のPK抵抗性  
 - 1 ; 作用時間の变化による影響



【図11】

HaCMF中PrPres及びMoCMF中PrPres蛋白のPK抵抗性  
- 2 ; PK濃度の影響

図  
11



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/53

識別記号

F I

C 1 2 N 5/00

キーワード (参考)

B

(72)発明者 津久井 和夫

東京都渋谷区広尾4丁目1番地31号 東京  
都赤十字血液センター内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA43 DA02 GA03

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13

4B065 AA92X AB05 AC14 BA08

CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 CA45 DA76

EA50 EA52 FA74 GA21